

# BIODEGRADASI SENYAWA AROMATIK OLEH *PSEUDOMONAS* SP ISOLAT I<sub>4</sub> DARI TABLET BAKTERI

T. Sembiring dan Lies Sriwuryandari

Balai Penelitian dan Pengembangan Fisika Lingkungan, Puslitbang Fisika Terapan- LIPI,  
Jl. Cisit 21/154 D, Kompleks LIPI, Bandung 40135

## INTISARI

Uji biodegradasi senyawa aromatik oleh isolat bakteri (isolat I<sub>4</sub>) dari tablet bakteri pendegradasi fenol telah dilakukan dengan menggunakan medium mineral sebagai medium pertumbuhan. Dalam percobaan tersebut senyawa aromatik yang diuji sebagai sumber karbon adalah senyawa fenol, klor-fenol, p-nitrofenol, 2,4 diklorfenol dan benzen. Isolat bakteri tersebut berbentuk bulat-oval motilitas tinggi tersebut dan termasuk bakteri aerob dan gram negatif. Bakteri ini dapat memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon, membentuk asam pada uji methyl merah, dan uji indol memberikan hasil negatif. Isolat tersebut memberikan warna hijau kebiruan pada agar miring dan tidak memanfaatkan ethanol. Karakteristika isolat I<sub>4</sub> tersebut mengindikasikan bahwa isolat ini tergolong *Pseudomonas*. Uji lebih jauh memakai medium selectife untuk *Pseudomonas* menunjukkan bahwa isolat I<sub>4</sub> adalah *Pseudomonas fluorescence*. Bakteri tersebut dapat mengoksidasi 2,4 diklorfenol. hasil pengujian menunjukan bahwa bakteri tersebut mampu mendegradasi 2,4. dichlorfenol dengan kecepatan yang cukup tinggi dan tumbuh pada larutan benzen 10 % (v/v).

**Kata kunci:** Tablet bakteri, senyawa aromatik, fenol, p-klorfenol, 2,4 diklorfenol, p-nitrofenol, benzen, kultur murni, *Pseudomonas fluorescence*, isolat I<sub>4</sub>.

## ABSTRACT

Biodegradation test of aromatic compounds by pure culture of bacterial isolate I<sub>4</sub> from bacterial tablet using mineral medium as growth medium was done. Aromatic compounds tested as carbon sources used were phenol, p-chlorphenol, p-nitrophenol, 2,4 dichlorphenol and benzene. The oval colony forming and high motility isolate is an aerobic and gram negatif bacteria. The isolate was able to use citric acid as carbon source, produced acid from methyl red test and gave negative result of indol test. The isolate formed a slightly blue-green colour colony on agar slant, and it did not use ethanol as carbon source. The characteristic of the isolate I<sub>4</sub> indicated that it belonged to the genus *Pseudomonas*. Test using selective media confirmed that the isolate I<sub>4</sub> is a *Pseudomonas fluorescence*. The capability of the bacteria to oxidize of 2,4 dichlorphenol was relatively fast. Experimental results showed that the bacteria grew on benzene at concentration of 10%(v/v), and degraded 2,4 dichlorphenol with relatively high rate.

**Keywords:** Bacterial tablet, aromatic compounds, phenol, p-chlorphenol, 2,4 dichlorphenol, p-nitrophenol, benzene, pure culture, *Pseudomonas fluorescence*, isolate I<sub>4</sub>.

## PENDAHULUAN

Pengetahuan tentang biodegradasi senyawa aromatik oleh bakteri telah cukup lama berkembang, bahan-bahan aromatik tersebut perlu ditangani dengan serius, karena sangat berbahaya bagi makhluk hidup, dan dapat menimbulkan kematian. Kematian diduga karena bahan kimia tersebut terlarut didalam membran lemak yang mengelilingi sistem syaraf, sehingga mengganggu transportasi vital berkenaan dengan masuk dan keluarnya ion pada urat syaraf. Transportasi ion pada urat syaraf berperan dalam transmisi impuls listrik sepanjang urat syaraf, sehingga gangguan transport tersebut akan mengakibatkan tremor dan konfusi<sup>(1)</sup>. Senyawa kimia yang mengandung organoklorin umumnya tetap tidak berubah dalam jangka waktu tertentu karena didalam air senyawa tersebut tidak mudah terdegradasi dan tidak mengalami hidrolisis, sehingga keberadaanya didalam lingkungan menempati waktu yang lama, menggunakan waktu paruh untuk menunjukkan waktu degradasi relatif di alam yaitu 2-4 tahun untuk bahan kimia organoklorin<sup>(2)</sup>.

Biodegradasi senyawa aromatik dapat dilakukan oleh bakteri campuran ataupun kultur tunggal. Pemakaian kultur campuran akhir akhir ini telah berkembang lebih jauh dengan menggunakan sediaan dalam bentuk powder ataupun tablet/pellet bakteri campuran. Tablet bakteri yang mengandung sejumlah spesies bakteri yang berperan didalam mendegradasi senyawa phenol dan senyawa aromatik lainnya telah dilaporkan<sup>(3,4,5)</sup>. Dalam kegiatan differensiasi bakteri penghancur phenol dari tablet bakteri tersebut diperoleh dua isolat yaitu isolat I<sub>8</sub> dan isolat I<sub>4</sub> yang sangat dominan di dalam tablet tersebut dan mungkin yang paling berperan dalam mendegradasi senyawa aromatik baik phenol, klorofenol, nitrofenol, 2,4 diklorofenol dan senyawa aromatik lainnya<sup>(6)</sup>. Telah dilaporkan bahwa bakteri isolate I<sub>8</sub> selain mendegradasi phenol dan klorofenol, juga sanggup menggunakan annilin sebagai sumber karbon<sup>(7)</sup>. Isolat I<sub>4</sub> tersebut adalah bakteri aerob yang selain mendegradasi phenol juga tumbuh dalam medium mineral yang mengandung benzen. Disini disampaikan sifat sifat morfologis. fisiologis bakteri tersebut disamping kemampuannya mendegradasi senyawa aromatik.



## BAHAN DAN METODA

### 1. Media dan substrat pertumbuhan

Sebagai medium untuk pertumbuhan bakteri digunakan medium mineral dengan komposisi 2.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.34 g  $\text{MgCl}_2$ ; 6  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0.01 g  $\text{CaCl}_2$ ; 2  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05 g  $\text{FeSO}_4$  dan 5 ml trace elemen dalam 1000 ml. aquades. Kondisi pH dijaga pada pH netral (pH 6.5 - 7.0) dengan larutan penyangga. Untuk sumber karbon dipergunakan 2.4 dichlorphenol p.a. atau dengan penambahan nutrisi broth. Untuk medium padat ditambahkan 10 g/l bacto agar. Medium tersebut dipergunakan juga dalam tahap isolasi dan karakterisasi. Sebelum dipakai seluruh reagensia dan media terlebih dahulu disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit.

### 2. Analisis Senyawa aromatik dan Bioderivasi Fenol/klorofenol

Percobaan dilakukan dengan cara menginokulasikan 2 ml. suspensi bakteri ( $\text{OD} = 0.2$ ) ke dalam 300 ml. medium mineral di dalam sebuah erlenmeyer berkapasitas satu liter. Senyawa aromatik adalah sumber karbon satu-satunya yang ditambahkan ke dalam medium. Kondisi percobaan diatur pada tingkat keasaman (pH) netral, suhu inkubasi pada suhu kamar (27°C) dan dengan pengadukan 300 rpm (magnetik stirrer). Analisis sample dilakukan setiap waktu yang ditetapkan, meliputi penentuan konsentrasi dan fenol dan 2.4. dichlorfenol dan jumlah bakteri. Penentuan konsentrasi 2.4. dichlorfenol dan fenol dilakukan dengan menggunakan HPLC (Shimadzu, Japan), dengan menggunakan kolom pemisah aromatik supercoil LC-PCP. Analisis dilakukan pada kondisi isokratik dengan menggunakan kecepatan aliran eluen 0.8 ml/menit. Eluen yang dipergunakan adalah campuran metanol dan aquabides pada perbandingan 70 : 30 (v/v). Senyawa aromatik dideteksi secara spektrofotometris (detektor UV-VIS) pada panjang gelombang 270 nm. Hasil yang diperoleh direkam pada integrator CR-70. sedangkan untuk jumlah bakteri ditentukan berdasarkan densitas optis dengan menggunakan spektrofotometer (Shimadzu-Japan) yang dioperasikan pada 578 nm.

### 3. Isolasi dan pemurnian

Tablet bakteri yang dipakai sebagai sumber bakteri adalah tablet yang dibuat dengan bahan yang terdiri atas biomassa bakteri campuran penghancur phenol, mineral alam dan aditif lain<sup>(4)</sup>. Satu bagian suspensi bakteri dilarutkan secara seri sehingga diperoleh pengenceran dari  $10^{-2}$  s/d  $10^{-6}$ . Kemudian dari tiap pengenceran tersebut dibuat goresan pada medium plat-agar. Tahap ini dilakukan beberapa kali ulangan sampai diperoleh koloni yang tumbuh

terpisah (*single cell colony*). Koloni tunggal yang diperoleh kemudian ditumbuhkan didalam media pertumbuhan dengan sumber karbon phenol dan inkubasi dilakukan pada suhu kamar (27°C). Kemudian bakteri yang tumbuh juga diamati berdasarkan morfologinya dengan menggunakan mikroskop (Leitz, Germany) pada fasa kontras dengan perbesaran 1250 kali.

### 4. Karakteristik bakteri isolat I<sub>4</sub>

Karakterisasi dilakukan berdasarkan sifat morfologi bakteri pada berbagai substrat pertumbuhan serta sebagian uji fisiologi dan pewarnaan gram. Selain itu juga dilihat kemampuan pertumbuhannya didalam berbagai substrat aromatik alkohol dan karbohidrat. Koloni isolat I<sub>4</sub> yang tumbuh pada plat-agar diamati sifat morfologinya berdasarkan bentuk, ukuran diameter, warna dan kilat koloni, selain itu juga diamati sifat morfologinya pada media agar miring.

### 5. Pengujian pertumbuhan dalam berbagai sumber karbon

Karakterisasi sifat morfologis diuji pada substrat nutrisi cair, substrat pertumbuhan 2.4.dichlorphenol dengan variasi kadar garam dan penggunaan ammonium. Percobaan dilakukan dengan cara menginokulasikan satu tetes suspensi bakteri ke dalam lima (5) ml substrat cair di dalam tabung reaksi yang diberi tutup kapas. Selama waktu inkubasi dilakukan pengambilan sample untuk diamati bentuk-bentuk sel dan jumlah selnya (jumlah relatif). Pengamatan dilakukan tiap hari dengan cara mengambil suspensi bakteri tersebut dan meletakkan diatas gelas kaca sebanyak 2 ml. Tahap selanjutnya dilakukan pemisahan kedalam substrat pertumbuhan yang baru, dengan cara menginokulasikan satu tetes suspensi bakteri dari kultur sebelumnya kedalam 5 ml substrat yang baru. Pengamatan dilakukan seperti langkah sebelumnya. Tahap pemindahan dilakukan sampai beberapa kali.

Medium pertumbuhan yang dipergunakan adalah medium mineral dengan menggunakan sumber karbon berupa senyawa aromatik (selain Phenol), alkohol dan karbohidrat. Senyawa aromatik yang digunakan adalah 10.25 mg/l p-Nitrophenol, 51.42 mg/l p-Chlorophenol, 93.13 mg/l anilin, dan 178.4 mg/l asam benzoat. Jenis-jenis alkohol yang dipergunakan adalah methanol, ethanol dan isopropanol, masing-masing dengan konsentrasi 10% (v/v) dan karbohidrat yang dipergunakan adalah glukosa monohidrat.

Uji pewarnaan gram dilakukan terhadap biakan isolat bakteri I<sub>4</sub> pada fase eksponensial, dimana diperoleh ukuran dan bentuk sel yang seragam. Dalam uji fisiologis untuk katalase dilakukan dengan menggunakan larutan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% serta uji reduksi nitrat dan nitrit.



## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan dan evaluasi morfologi dan fisiologi isolat I<sub>4</sub>

Dalam proses pemurnian, bakteri I<sub>4</sub> ditumbuhkan didalam medium cair yang mengandung nutrisi standar untuk pertumbuhan bakteri, kemudian diambil 2 ul dan diamati morfologinya dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1250 kali dan fase kontras. Selanjutnya dilakukan berbagai uji fisiologis untuk mengetahui sifat dan karakteristik bakteri secara global. Hasil dari pengujian terhadap isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji fisiologis dan karakteristik Isolat I<sub>4</sub>

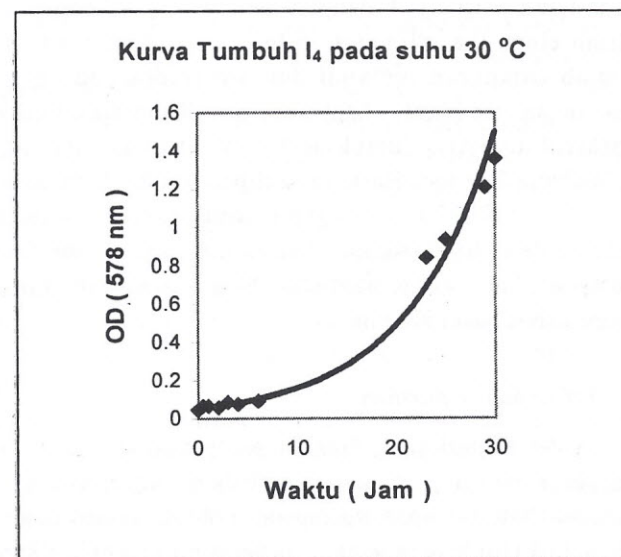
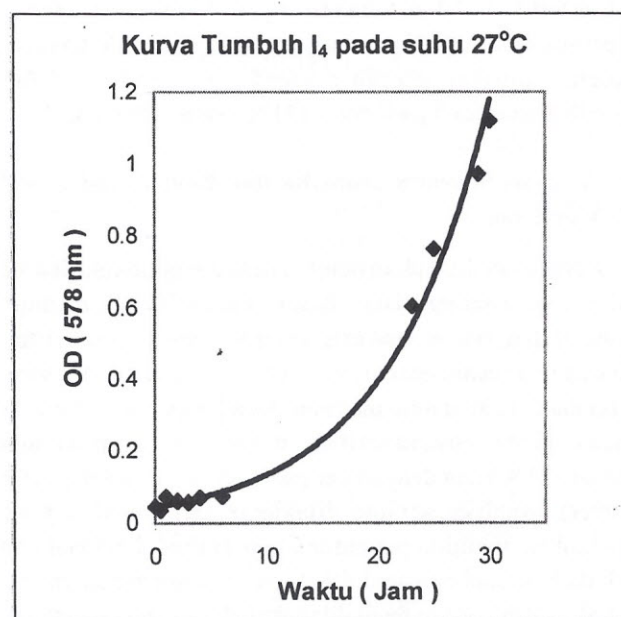
No.	Parameter	<i>P. fluorescens</i> *	Isolat I <sub>4</sub>
1.	Bentuk koloni (agar miring)	td	bulat, transparan
2.	Pembentukan pigmen	positif (+)	positif (+)
3.	Motilitas	positif (+)	positif (+)
4.	Bentuk sel	bulat	bulat-oval
5.	Gram	negatif (-)	negatif (-)
6.	Uji Indol	negatif (-)	negatif (-)
7.	Uji Katalase	positif (+)	positif (+)
8.	Uji Sitrat	positif (+)	positif (+)
9.	Methyl Red	positif (+)	positif (+)

\* Caldini *et al* (1995)

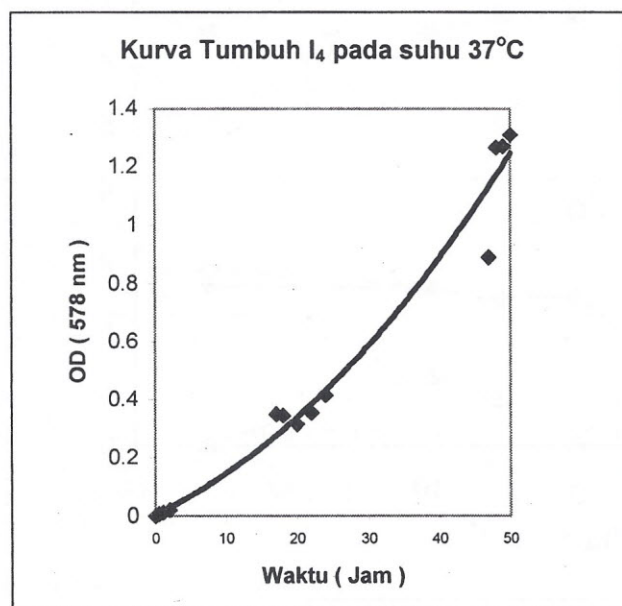
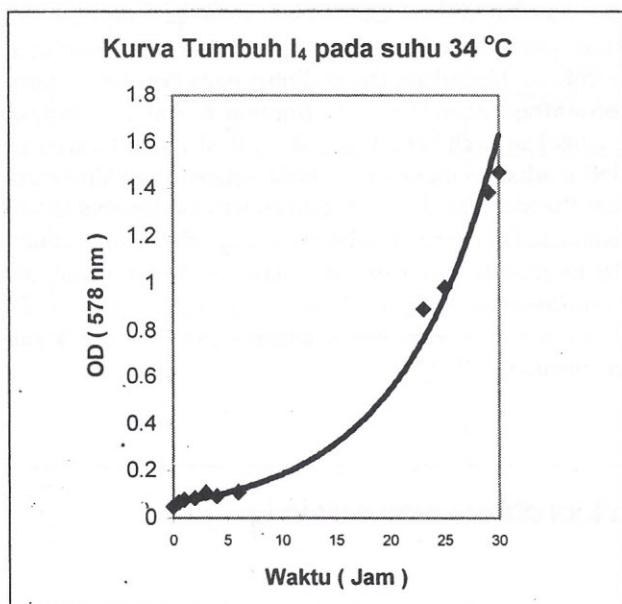
Dari hasil pengujian yang dilakukan diperoleh bahwa: morfologi koloni memberi warna yang mengkilat flurecens, dengan pigmen hijau kebiruan. Bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif, bersifat aerob dan tidak menggunakan ethanol dalam metabolismenya. Pengamatan morfologis terhadap bentuk dan motilitas bakteri ini serta uji fisiologis yang telah disebutkan didepan mengindikasikan bahwa bakteri tersebut dari spesies *Pseudomonas*<sup>(8,9)</sup> Determinasi lebih lanjut dengan menggunakan media selektif untuk *pseudomonas* (Difco) dan membandingkan hasil pengujian

dengan yang sifat-sifat *P. fluorescens* yang di isolasi dari tanah yang terkontaminasi dengan minyak<sup>(10)</sup> diperoleh bahwa isolat I<sub>4</sub> adalah *Pseudomonas fluorescens*.

Penentuan kecepatan pertumbuhan isolat bakteri strain I<sub>4</sub> dilakukan dengan menumbuhkannya pada medium mineral dalam erlemeyer ukuran 150 ml. Bakteri diinokulasikan kedalam media mineral cair (20 ml) dan diinkubasi pada suhu 27,30,34 dan 37°C. Kemudian diamati densitas optisnya (OD) untuk menentukan "doubling time". Gambar 1.2 dan 3 berikut ini menunjukkan pertumbuhan bakteri tersebut.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* isolat I<sub>4</sub> didalam medium mineral cair pada suhu inkubasi 27 dan 30°C.



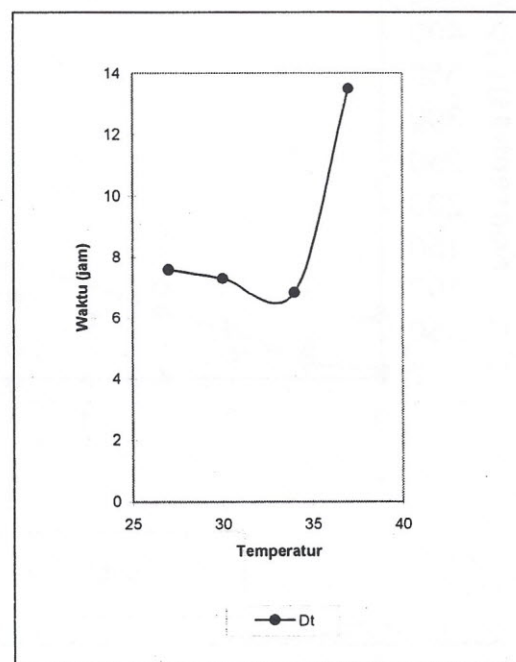
Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* Isolat I<sub>4</sub> dalam media mineral cair, pada suhu inkubasi 34 dan 37°C.

Dari gambar diatas dapat ketahui bahwa *Pseudomonas fluorescens* isolat I<sub>4</sub> dapat tumbuh dengan baik pada suhu 27-37°C dengan *doubling time* yang bervariasi antar 6,84–13,5 jam, pada suhu inkubasi 27 dan 30°C menunjukkan *doubling time* bakteri yang tidak jauh berbeda berkisar antara 7.3–7,6 jam sedangkan pada suhu inkubasi 34°C adalah paling cepat yaitu 6.84 jam. Kecenderungan perubahan *doubling time* generasi isolat tersebut ditampilkan pada Gambar 3. berikut ini.

Tabel 2 : *Doubling time* bakteri *P. fluorescens* isolat I<sub>4</sub>

Suhu (°C)	Doubling time (Jam)	Generation time sel/jam
27	7.6	0.132
30	7.3	0.137
34	6.84	0.146
37	13.5	0.07

Dari Table 2 dan Gambar 3, dapat dilihat bahwa pertumbuhan bakteri tersebut paling optimum berada pada kisaran suhu 30°C – 34°C, sedangkan pada suhu diluar kisaran ini pertumbuhan bakteri isolat I<sub>4</sub> tersebut menurun seperti dapat dilihat pada gambar bawah pada suhu 37°C pembelahan sel sangat lambat sekali. Dengan demikian bakteri tersebut masuk dalam klasifikasi bakteri mesofil.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap *doubling time* *P. fluorescens* isolat I<sub>4</sub>. Dt: Trendline *doubling time*

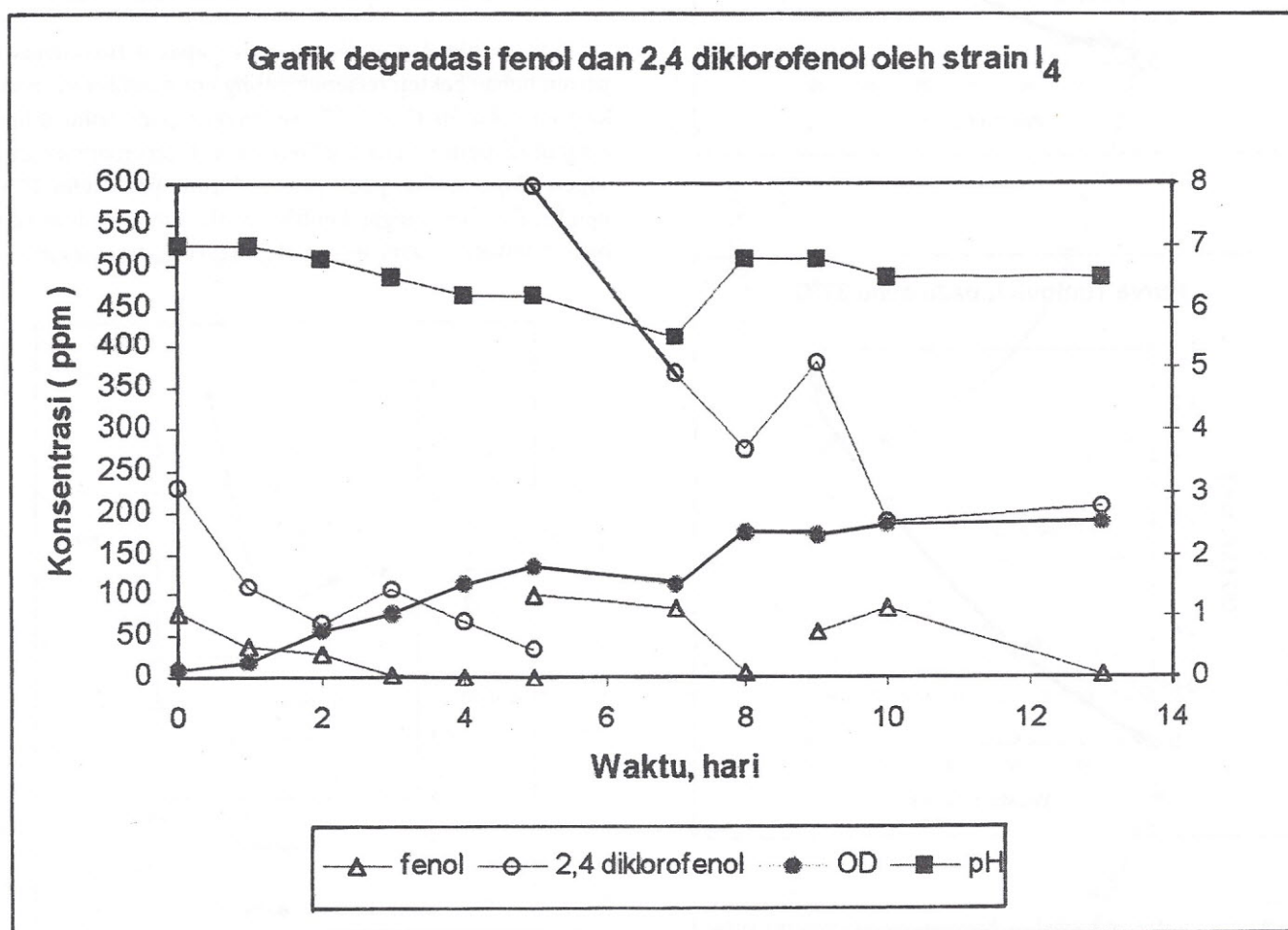
#### Biodegradasi phenol dan 2,4-dichlorphenol oleh *P.fluorescens* strain I<sub>4</sub>

*Pseudomonas fluorescens* strain I<sub>4</sub> tersebut diperoleh dari hasil pemisahan bakteri campuran pendegradasi phenol, sehingga perlu dilakukan pengujian kembali kemampuan biodegradasinya terhadap phenol dan 2,4-dichlorophenol.



Hasil penelitian terhadap biodegradasi phenol dan 2,4 dichlorophenol tersebut dapat dilihat pada Gambar 4. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa bakteri tersebut dapat mendegradasi phenol dan 2,4. dichlorphenol dengan baik. Konsentrasi phenol turun sekitar 40 mg/l selama 24 jam dan mencapai konsentrasi minimal sampai hari ke 5. Pada periode yang sama konsentrasi 2,4 diklorofenol turun dari 231,17 mg/l menjadi 34,9 mg/l. Pada hari kelima tersebut kemudian dilakukan penambahan phenol sehingga konsentrasi menjadi menjadi 100 mg/l dan 2,4 diklorofenol menjadi 600 mg/l didalam suspensi bakteri. Biodegradasi kedua senyawa tersebut oleh *Pseudomonas fluorescens* strain I<sub>4</sub> cukup cepat. Pada hari ke

13 konsentrasi fenol didalam suspensi tinggal hanya 2,41 mg/l sementara 2,4 diklorofenol sekitar 208 mg/l. saat mana percobaan dihentikan. Dapat dilihat pada Gambar 4. bahwa konsentrasi phenol sangat fluktuatif. Hal ini mungkin disebabkan oleh terjadinya akumulasi phenol dari hasil biodegradasi 2,4 diklorofenol. Pada metabolisme klorobenzoat oleh *Pseudomonas* B13, Penguraian senyawa tersebut terlebih dahulu melalui benzoat sebelum terdegradasi lebih lanjut<sup>(11)</sup>. Hal ini juga ditemui pada degradasi senyawa aromatik oleh *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Pseudomonas* sp yang lain terhadap senyawa aromatik yang tersubstitusi<sup>(12, 13, 14, 15)</sup>.



Gambar 4: Biodegradasi fenol dan 2,4-diklorofenol oleh *Pseudomonas fluorescens* isolat I<sub>4</sub>

#### Substrat pertumbuhan untuk *Pseudomonas fluorescens* isolat I<sub>4</sub>

Untuk mengetahui karakteristik bakteri ini dalam memanfaatkan sumber karbon dalam pertumbuhannya, maka dilakukan pengujian terhadap kemampuannya dalam menggunakan berbagai macam substrat untuk pertumbuhan tersebut. Dari hasil pengujian yang dilakukan terhadap

beberapa senyawa sumber karbon dapat dilihat (Tabel.2) bahwa bakteri tersebut selain dapat menggunakan senyawa aromatik tersubstitusi pada rantai karbonnya misalnya fenol, klorofenol, nitrofenol, dan 2,4 diklorofenol, ternyata strain tersebut juga dapat menggunakan benzen pada konsentrasi 10 % (v/v). Konsentrasi benzen tersebut dapat dieliminir dalam waktu 6 hari.



Tabel 2: Pemanfaatan berbagai substrat oleh isolat I<sub>4</sub>

No.	Sumber karbon	Konsentrasi	Pertumbuha/ Biodegradasi
1.	Nutrien Broth	8 gr/lt	+++
2.	Yeast Ekstrak	4 gr/lt	+++
3.	4-Chlorophenol	100 ppm	++
4.	2,4-Dichlorophenol	50 ppm	++
5.	4- Nitrophenol	50 ppm	++
6.	Phenol	150 ppm	+++
7.	Glucosa + Methylene Blue	2% w/v	+++b
8.	Glucosa + Methylred	2% w/v	+++c
9.	Glucosa	2% w/v	+++
10.	Glucosa + Bromthymolblue	2% w/v	+++a
11.	Ethanol	10% v/v	-
12.	Asam Laktat	10% v/v	-
13.	Anilin	10% v/v	-
14.	Methanol	10% v/v	-
15.	Isopropanol	10% v/v	-
16.	Benzene	10% v/v	+++
17.	Acetonitril	10% v/v	-
18.	Asam asetat	10% v/v	-
19.	Methylene blue	0.01 %	- *
20.	Bromthymolblue	0.02 %	- *
21.	Methylred	0.01 %	- *

Keterangan:

- a) terjadi perubahan warna dari biru menjadi hijau (2 x 24 jam)
- b) terjadi perubahan warna dari biru menjadi bening pada lapisan bawah sebelum dikocok. (2 x 24 jam)
- c) terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning. (2 x 24 jam)
- \*) tidak terjadi degradasi warna maupun pertumbuhan sel selama 2 x 24 jam.

Konsentrasi benzen 10% (v/v) tersebut cukup tinggi dan merupakan suatu potensi yang sangat besar dalam usaha bioremediasi lahan atau badan perairan yang tercemar dengan petroleum atau limbah industri petroleum. Namun strain tersebut tidak dapat dipakai dalam mineralisasi bahan pewarna/indicator warna seperti bromo-thymol-blue, methylene blue, methyl merah, dan juga tidak menggunakan methanol, ethanol dan isopropanol dari golongan alkohol serta asam asetat, asam laktat, asetonitril dan annilin. Pada pengujian ini terutama didapatkan bahan dari sumber karbon jenis aromatik cenderung dapat digunakan dengan baik. Senyawa aromatik tersebut di degradasi sampai habis kecuali pada substrat anilin dimana bakteri ini tidak dapat tumbuh dengan baik.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa isolat I<sub>4</sub> tersebut adalah bakteri yang termasuk jenis *Pseudomonas fluorescens*, bersifat gram negatif dan tumbuh pada kondisi mesofil dengan temperatur optimum antara 30–34. Bakteri ini mampu mendegradasi phenol dan 2,4 diklorofenol pada kecepatan yang cukup tinggi yaitu 228.27 mg/l.hari serta benzen pada konsentrasi 10 % (v/v). Bakteri ini sangat berpotensi untuk dipakai dalam bioremediasi lahan atau badan perairan yang tercemar oleh senyawa tersebut diatas.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan kepada Puslitbang Fisika Terapan – LIPI yang membiayai penelitian ini, Ekoputra Agung Priantoro, Srimarliah, Elsy dan Ambar Susilorukmi serta yang membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Fardiaz, S., *Polusi air & udara*, Kanisius, Jakarta, (1992).
- Pitts, J.N. dan Metcalf, R.L. *Advances in Environmental Sciences*, Wiley Interscience, New York, (1969).
- Sembiring, T., Susilorukmi, A., dan Sriwuryandari, L. Biodegradasi Phenol dan Turunannya dengan Mikroorganisme Campuran. Disajikan pada Seminar Nasional Jaringan Kerjasama Kimia Analitik Indonesia. Desember., Yogyakarta, (1996).
- Sembiring, H. dan Sembiring T., Optimalisasi Sifat Campuran Zeolit Dan Dolomit Sebagai Media Dalam Peletisasi Bakteri, *Bulletin IPT*, (1998).
- Sembiring, T., Susilorukmi, A., dan Sembiring, H., Uji Viabilitas Bakteri Penghancur Phenol Dalam Pellet Dolomit, Zeolit Dan Carbon Aktif. *Teknologi Indonesia*, XXII.
- Sembiring, T. Utilization of Bacterial Tablet for Bioremediation of Petrochemical and Aromatics Contaminated Soil in *Proceedings of Asia-Pasific Workshop on: Ecohydrology*. (in press) Organized by IHP-V, UNESCO, LIPI and UNDP, Cibinong, Marth (2001).
- Sembiring, T., Susilorukmi, A. Karakterisasi Partial Isolat Bakteri Pendegradasi Phenol dari Tablet Bakteri. *JKTI Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, vol. IX, no. 1-2, (1999).
- Kiss, I (ed), *Testing Methods In Food Microbiology*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, (1984).
- Schlegel, H.G. *Algeucine Mikrobiologic*, 6 Ueberarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New york. pp. 571, (1985).
- Caldini, G., Cenci, G., Manenti, R., and G. Morozzi. *The Ability Of An Environmental Isolate Pseudomonas fluorescens To Utilize Chrysene And Other Four-Ring polynuclear Aromatics Hydrocarbon*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* no.44 : pp. 225-229 (1995).

11. Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W., H-J. Knackmus. Isolation and Characterization of a p-Chlorbenzoate Degrading Pseudomonad. *Arch. Microbiol.* 99 : pp. 61-70 (1974).
12. Johnsen, J. Utilization of Benzylpenicillin as Carbon, Nitrogen and Energy source by a Pseudomonas fluorescens Strain. *Arch. Microbiol.* 115: pp. 271-275 (1977).
13. Spain, J.C., and Gibson, D.T., Oxydation of Substituted Phenols by Pseudomonas putida F1 and Pseudomonas sp Strain JS6 *Appl and Env. Microbiol.* 54. No.6 : pp. 11399 - 11404, (1988).
14. Reineke, W., and Knackmus, H-J. Microbial Degradation of Haloaromatics. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: pp. 263-287, (1988).
15. Hartmann, J., Engelberts, K., Nordhaus, B., Schmidt, E. and W. Reineke. Degradation of 2-Chlorbenzoate by In Vivo Constructed Hybrid Pseudomonads. *FEMS Microbiology Letters* 61 : pp. 17-22 (1989).